

## 基于 M-C 作图鉴定牙鲆不同二倍体的遗传特征

韩慧宗<sup>1</sup>, 蒋丽<sup>2</sup>, 刘奕<sup>3</sup>, 王桂兴<sup>4</sup>, 刘海金<sup>2</sup>, 刘永新<sup>2\*</sup>, 刘英杰<sup>2\*</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院, 北京 100141;

3. 东北农业大学动物科学技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150030;

4. 中国水产科学研究院北戴河中心实验站, 河北 秦皇岛 066100)

**摘要:** 为了分析连锁群上不同位置的微卫星标记对鉴定牙鲆二倍体遗传特征的作用, 实验以牙鲆选育基础群体为亲本, 选择性腺发育良好的个体制备普通二倍体(ND), 减数分裂雌核发育二倍体(MGD-1)、连续两代减数分裂雌核发育二倍体(MGD-2), 并利用 MGD-1 发育达性成熟的雌鱼与同时诱导的性反转伪雄鱼交配制备近交二倍体(MGD1H)。从牙鲆遗传连锁图谱选择均匀分布于 24 个连锁群的 72 个微卫星标记, 用 4 个 MGD-1 家系估计微卫星标记与着丝粒之间的相对距离。在假设无交叉干涉的情况下, 17 个标记位于着丝粒区域, 19 个标记位于连锁群中部, 36 个标记位于远着丝粒区域。分别选择上述区域的微卫星标记鉴定牙鲆 4 种二倍体的遗传特征。结果显示, 4 种二倍体的等位基因数(A)和多态信息含量(PIC)在不同区域变化范围较小, ND 的 A 和 PIC 均为最高, MGD1H 则表现为最低。随着标记与着丝粒之间距离的增加, 4 种二倍体的观测杂合度逐渐升高, 纯合度逐渐降低。纯合个体比例在着丝粒区域最高, 为 8.8%~29.1%; 在远着丝粒区域最低, 为 2.4%~23.2%。其中, MGD-1 和 MGD-2 的变化幅度显著高于其余二倍体。结果表明, 选择连锁群上不同位置的微卫星标记对鉴定牙鲆不同二倍体的遗传特征具有显著影响。

**关键词:** 牙鲆; 微卫星; 着丝粒; 雌核发育二倍体; 遗传图谱

**中图分类号:** Q 343; S 917.4

**文献标志码:** A

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 隶属鲽形目 (Pleuronectiformes), 鲆科 (Bothidae), 牙鲆属 (*Paralichthys*), 俗有比目鱼、牙片、偏口等称谓, 在我国以黄、渤海分布最为广泛。由于其繁殖力高, 个体大, 生长快, 肉质鲜美, 已成为我国海水养殖鱼类中的重要品种之一<sup>[1]</sup>。近年来, 随着牙鲆野生资源的严重枯竭和养殖规模的日益扩大, 养殖苗种表现出生长速度下降, 抗病、抗逆性降低等现象, 因此急需从遗传方面改良牙鲆的种质来解决生产中遇到的实际问题。选择育种技术、杂交育种技术和雌核发育育种技术都是改良品种的有效方法。其中, 人工诱导减数分裂雌核发育具有固定母本性状的作作用, 且子代个体遗传相似度高,

能够大幅缩短培育新品种的选育周期<sup>[2-4]</sup>, 在育种实践中越来越受到人们的重视。目前, 海水鱼类中已经成功诱导了河鲀 (*Tetraodon fluviatilis*)<sup>[5]</sup>、牙鲆<sup>[6-7]</sup>、条斑星鲽 (*Verasper moseri*)<sup>[8]</sup>、欧鲆 (*Dicentrarchus labrax*)<sup>[9]</sup>、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)<sup>[10-11]</sup>、泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*)<sup>[12]</sup>、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)<sup>[13]</sup> 和黄盖鲽 (*Limanda yokohamae*)<sup>[14]</sup> 等。

关于牙鲆二倍体的遗传分析研究已有众多报道, 如有丝分裂雌核发育二倍体的纯合性评价与亲子鉴定<sup>[15-16]</sup>, 减数分裂与有丝分裂雌核发育二倍体的遗传差异比较<sup>[3]</sup>, F<sub>1</sub> 近交系的遗传检

收稿日期:2012-09-27 修回日期:2012-12-17

资助项目:国家科技支撑计划(2012BAD26B01);中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2012C012)

通信作者:刘永新, E-mail:liuyx@cafs.ac.cn; 刘英杰, E-mail:lyj@cafs.ac.cn

测<sup>[17]</sup>,连续两代减数分裂雌核发育二倍体的遗传特征分析<sup>[4]</sup>等。在这些研究当中,所使用的标记均从遗传连锁图谱随机抽取,没有考虑标记在染色体上距离着丝粒的相对位置。针对此点,本实验选择均匀分布于牙鲆24个连锁群的72个微卫星标记,利用减数分裂雌核发育二倍体家系估计标记与着丝粒(microsatellite-centromere, M-C)之间的相对距离,将标记定位在着丝粒、连锁群中部和远着丝粒3个区域。分别利用这些位置的微卫星标记进行牙鲆不同二倍体的遗传分析,验证标记在连锁群上的位置不同,其鉴定出的二倍体遗传特征也具有一定的差异性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用亲鱼选择中国水产科学研究院北戴河中心实验站牙鲆选育基础群体。普通二倍体的制备采用人工挤压腹部的方法获取精液和卵子。将稀释的精液与卵子充分混合,室温静置2 min后,加入16℃海水激活,5 min后放入网箱中孵化。诱导减数分裂雌核发育二倍体(meiotic gynogenetic diploid, MGD-1)的母本与普通二倍体相同,制备方法与条件参照刘海金等<sup>[2]</sup>,用经紫外线灭活的真鲷精子激活牙鲆卵子,2 min后转移到0℃的海水中进行冷休克处理45 min,完成MGD-1操作流程。培育MGD-1至性成熟,挑选性腺发育良好的个体再行诱导一次减数分裂雌核发育,方法同上,制备出的个体为连续两代减数分裂雌核发育二倍体(MGD-2)。同样选择MGD-1发育至性成熟的雌性个体与同一批鱼经高温诱导获得的伪雄鱼个体交配制备近交二倍体(MGD1H)。所有二倍体均采用常规方法进行养殖。

### 1.2 基因组DNA的提取

所有亲本采集腹面胸鳍样品,不同二倍体则养殖至90日龄,每种二倍体随机选取32尾个体采集尾部鳍条样品。DNA提取流程:将裂解液[50 mmol/L NaCl, 30 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 200 mmol/L EDTA(pH 8.0), 1% SDS, 200 μg/mL Proteinase K]加入剪碎的鳍条中,50℃消化至澄清,等体积的饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提一遍,2.5倍体积预冷的异丙醇沉淀,0.1 mL 70%乙醇清洗沉淀,TE溶解,-20℃保存待用。

提取完成后,采用琼脂糖凝胶电泳检测DNA样品的质量,紫外分光光度计测定OD<sub>260</sub>值,确定DNA的浓度。

### 1.3 微卫星标记

72个高多态性的微卫星标记选自牙鲆二代遗传连锁图谱<sup>[18]</sup>,每个连锁群3个标记,由GenBank获得引物系列或微卫星序列,利用SSRHunter软件和Primer 3.0设计引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物名称、连锁群、核心序列及GenBank登录号见表1。

### 1.4 PCR反应及电泳

PCR反应体系为15 μL,包括10×Buffer 2.5 μL、Mg<sup>2+</sup>(25 mmol/L)1 μL、dNTPs(2 mmol/L)1 μL、上下游引物(10 mmol/L)各0.6 μL、模版1 μL(30~50 ng)、Taq DNA聚合酶1 U,加适量ddH<sub>2</sub>O。反应程序如下:94℃预变性3 min,94℃变性30 s,退火30 s,72℃延伸30 s,25个循环,最后延伸10 min,PCR扩增使用PE9700型PCR仪完成。PCR扩增产物经8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,电泳后用1%硝酸银染色10 min,显色液显色10 min。凝胶在HP scanjet G4010扫描仪成像,Gel-Pro Analyzer 4.5凝胶分析软件对电泳谱带进行数据采集和分析。

### 1.5 统计分析

4个样本的组成情况:ND组为正常两性生子代32尾,MGD-1组为一尾野生鱼诱导减数分裂雌核发育产生的子代32尾,MGD-2组为MGD-1发育至性成熟的个体再行诱导减数分裂雌核发育产生的子代32尾,MGD1H组为MGD-1发育至性成熟的雌性个体与同批诱导的伪雄鱼杂交产生的子代32尾。每一个M-C之间重组率(recombination frequency,  $r$ )的计算采用基因型表现为杂合的母本诱导减数分裂雌核发育子代中杂合态的基因型个体数占总个体数的比例进行估计。在假设完全干涉的情况下,M-C图谱距离等于 $100(r/2)$ <sup>[19]</sup>。根据M-C图距,将微卫星标记分成着丝粒、连锁群中部和远着丝粒3个区域。利用不同区域的标记进行4种二倍体的遗传分析,遗传多样性的统计指标用等位基因数(number of alleles,  $A$ )、多态座位的观测杂合度(observed heterozygosity,  $H_o$ )、多态信息含量(polymorphism information content,  $PIC$ )和纯合度(homozygosity,  $H$ )来反应不同二倍体的特征,

由 Popgene (Version 3.2) 软件进行统计指标的计算。

观测杂合度:  $H_o = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$ , 多态信息含量:

$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$ , 其中,  $n$  为等位

基因数,  $i$  为位点数,  $P_i, P_j$  为等位基因频率。期望杂合度 (expected heterozygosity,  $H_e$ ) 的计算方法参照刘贤德等<sup>[20]</sup>, 根据亲本的基因型进行推算。如 ND 组的亲本基因型为 AB × CD, 按照分离定律

子代基因型比例应为 AC: AD: BC: BD = 1: 1: 1: 1, 期望杂合度应为 1.0。MGD-1 和 MGD-2 组只有一个亲本, 若其基因型为 AB, 则子代基因型比例应为 AA: AB: BB = 1: 2: 1, 期望杂合度应为 0.5。MGD1H 组的亲本基因型为 AB × AB, 子代基因型比例应为 AA: AB: BB = 1: 2: 1, 期望杂合度应为 0.5。同时, 统计 4 种二倍体在多态性位点的纯合个体数、杂合个体数及所占比例。

表 1 72 个微卫星标记的名称、连锁群、核心序列和 GenBank 登录号

Tab. 1 Locus, core sequences, linkage group and accession number in GenBank of 72 microsatellite loci

标记 locus	连锁群 linkage group	核心序列 core sequence	登录号 GenBank accession no.	标记 locus	连锁群 linkage group	核心序列 core sequence	登录号 GenBank accession no.
<i>Poli784TUF</i>	1	(TG) <sub>38</sub>	EF112749	<i>Poli1446TUF</i>	13	(TAG) <sub>16</sub>	DQ889011
<i>Poli1181TUF</i>	1	(CA) <sub>20</sub>	EF112955	<i>Poli1797TUF</i>	13	(CA) <sub>20</sub>	AB459084
<i>Poli1076TUF</i>	1	(AC) <sub>34</sub>	AB458945	<i>Poli966TUF</i>	13	(CA) <sub>15</sub>	EF112892
<i>Poli824TUF</i>	2	(TG) <sub>10</sub>	EF112781	<i>Poli818TUF</i>	14	(CA) <sub>14</sub>	EF112777
<i>Poli866TUF</i>	2	(TG) <sub>33</sub>	EF112814	<i>Poli1260TUF</i>	14	(TG) <sub>17</sub>	EF113016
<i>Poli1077TUF</i>	2	(CA) <sub>11</sub>	AB458946	<i>Poli1819TUF</i>	14	(CA) <sub>25</sub>	AB459105
<i>Poli1431TUF</i>	3	(GCA) <sub>13</sub>	DQ888996	<i>Poli637TUF</i>	15	(AC) <sub>12</sub>	EF112597
<i>Poli1106TUF</i>	3	(CA) <sub>29</sub>	AB458951	<i>Poli9-8TUF</i>	15	(CA) <sub>12</sub>	AB037989
<i>Poli1831TUF</i>	3	(CA) <sub>20</sub>	AB459116	<i>Po13</i>	15	(CA) <sub>13</sub>	AB046746
<i>Poli1393TUF</i>	4	(GCA) <sub>8</sub>	DQ888958	<i>Poli1755TUF</i>	16	(CA) <sub>24</sub>	AB459046
<i>Poli1359TUF</i>	4	(CA) <sub>12</sub>	DQ888932	<i>Poli1659TUF</i>	16	(CA) <sub>21</sub>	AB458989
<i>Poli148TUF</i>	4	(TG) <sub>16</sub>	AB459422	<i>Po25A</i>	16	(GATG) <sub>10</sub>	AB046749
<i>Poli151TUF</i>	5	(CA) <sub>28</sub>	AB459425	<i>Poli1407TUF</i>	17	(CA) <sub>10</sub>	DQ888972
<i>Poli1120TUF</i>	5	(CA) <sub>33</sub>	EF112916	<i>Poli127TUF</i>	17	(CA) <sub>21</sub>	AB459404
<i>oli9TUF</i>	5	(CA) <sub>20</sub>	AB037980	<i>Poli1915TUF</i>	17	(CA) <sub>20</sub>	AB459185
<i>Poli1513TUF</i>	6	(CTT) <sub>22</sub>	DQ889072	<i>Poli1966TUF</i>	18	(CA) <sub>30</sub>	AB459226
<i>Poli134TUF</i>	6	(CA) <sub>14</sub>	AB459410	<i>Poli1864TUF</i>	18	(AC) <sub>16</sub>	AB459140
<i>Poli107TUF</i>	6	(CA) <sub>27</sub>	AB037990	<i>Poli1010TUF</i>	18	(CA) <sub>17</sub>	AB458907
<i>Poli1009TUF</i>	7	(GT) <sub>11</sub>	AB458906	<i>Poli975TUF</i>	19	(CA) <sub>11</sub>	EF112900
<i>Poli1801TUF</i>	7	(CA) <sub>12</sub>	AB459088	<i>Poli55MHFS</i>	19	(CA) <sub>18</sub>	AB459293
<i>Poli159TUF</i>	7	(CA) <sub>10</sub>	AB459431	<i>Poli1490TUF</i>	19	(CTT) <sub>7</sub>	DQ889052
<i>Poli1450TUF</i>	8	(AGC) <sub>7</sub>	DQ889015	<i>Poli1773TUF</i>	20	(AC) <sub>15</sub>	AB459063
<i>Poli1118TUF</i>	8	(CA) <sub>15</sub>	EF112915	<i>Poli1779TUF</i>	20	(AC) <sub>32</sub>	AB459069
<i>Poli1825TUF</i>	8	(GA) <sub>29</sub>	AB459110	<i>Poli1838TUF</i>	20	(CA) <sub>16</sub>	AB459120
<i>Poli1813TUF</i>	9	(CA) <sub>25</sub>	AB459099	<i>Poli1852TUF</i>	21	(CA) <sub>12</sub>	AB459132
<i>Poli1392TUF</i>	9	(TGC) <sub>6</sub>	DQ888957	<i>Poli1827TUF</i>	21	(CA) <sub>14</sub>	AB459112
<i>Poli1936TUF</i>	9	(CA) <sub>13</sub>	AB459201	<i>Poli1925TUF</i>	21	(CA) <sub>17</sub>	AB459193
<i>Poli753TUF</i>	10	(GT) <sub>18</sub>	EF112734	<i>Poli1451TF</i>	22	(AGC) <sub>11</sub>	DQ889016
<i>Poli1412TUF</i>	10	(AT) <sub>8</sub>	DQ888977	<i>Poli1579TUF</i>	22	(CA) <sub>31</sub>	AB458967
<i>Po15</i>	10	(CA) <sub>10</sub>	AB057727	<i>Poli1498TUF</i>	22	(AGA) <sub>15</sub>	DQ889058
<i>Poli1642TUF</i>	11	(AC) <sub>14</sub>	AB458985	<i>Poli1643TUF</i>	23	(CA) <sub>18</sub>	AB458986
<i>Poli1795TUF</i>	11	(CA) <sub>16</sub>	AB459082	<i>Poli193TUF</i>	23	(CA) <sub>21</sub>	AB459463
<i>Poli907TUF</i>	11	(TG) <sub>13</sub>	EF112845	<i>Poli-RC27-TUF</i>	23	(AC) <sub>24</sub>	AB030937
<i>Poli1327TUF</i>	12	(CA) <sub>10</sub>	EF113072	<i>Poli72MHFS</i>	24	(TG) <sub>23</sub>	AB459338
<i>Poli2031TUF</i>	12	(CA) <sub>32</sub>	AB459267	<i>Poli1906TUF</i>	24	(CA) <sub>16</sub>	AB459179
<i>Poli212TUF</i>	12	(CA) <sub>33</sub>	AB459478	<i>Poli1872TUF</i>	24	(CA) <sub>18</sub>	AB459147

## 2 结果

### 2.1 M-C 作图

表 2 列出了 72 个标记位点 M-C 之间的重组率和遗传距离。在 17 个位点观测到低 M-C 重组率(0.0 ~ 0.3), 36 个位点观测到高 M-C 重组率

(0.67 ~ 1.0), 其余 19 个位点观测到中等 M-C 重组率(0.3 ~ 0.67)。因此, 在假设完全干涉的情况下, M-C 之间的遗传距离范围为 0 ~ 50 cM。其中, 17 个位点位于着丝粒区域, 此区域是指位于着丝粒上或其附近; 19 个位点位于连锁群中部; 36 个位点位于远着丝粒区域。

表 2 72 个微卫星标记的 M-C 重组率和遗传距离  
Tab. 2 M-C recombination rate and map distance of 72 microsatellite loci

位点 locus	连锁群 linkage group	重组率 <i>r</i>	M-C 距离/cM M-C distance	位点 locus	连锁群 linkage group	重组率 <i>r</i>	M-C 距离/cM M-C distance
<i>Poli784TUF</i>	LG1	0.41	20.30	<i>Poli1446TUF</i>	LG13	0.86	42.95
<i>Poli1181TUF</i>	LG1	0.54	27.10	<i>Poli1797TUF</i>	LG13	0.98	49.20
<i>Poli1076TUF</i>	LG1	0.88	43.75	<i>Poli966TUF</i>	LG13	1.00	50.00
<i>Poli824TUF</i>	LG2	0.23	11.70	<i>Poli818TUF</i>	LG14	0.34	17.20
<i>Poli866TUF</i>	LG2	0.91	45.30	<i>Poli1260TUF</i>	LG14	0.50	25.00
<i>Poli1077TUF</i>	LG2	1.00	50.00	<i>Poli1819TUF</i>	LG14	0.69	34.40
<i>Poli1431TUF</i>	LG3	0.45	22.65	<i>Poli637TUF</i>	LG15	0.53	26.55
<i>Poli1106TUF</i>	LG3	0.68	33.85	<i>Poli9-8TUF</i>	LG15	0.97	48.45
<i>Poli1831TUF</i>	LG3	0.97	48.45	<i>Po13</i>	LG15	0.98	49.20
<i>Poli1393TUF</i>	LG4	0.00	0.00	<i>Poli1755TUF</i>	LG16	0.13	6.25
<i>Poli1359TUF</i>	LG4	0.34	17.20	<i>Poli1659TUF</i>	LG16	0.47	23.45
<i>Poli148TUF</i>	LG4	0.95	47.65	<i>Po25A</i>	LG16	1.00	50.00
<i>Poli151TUF</i>	LG5	0.53	26.55	<i>Poli1407TUF</i>	LG17	0.70	35.15
<i>Poli1120TUF</i>	LG5	0.72	35.95	<i>Poli127TUF</i>	LG17	0.72	35.95
<i>Poli9TUF</i>	LG5	0.94	46.90	<i>Poli1915TUF</i>	LG17	0.92	46.10
<i>Poli1513TUF</i>	LG6	0.11	5.45	<i>Poli1966TUF</i>	LG18	0.20	10.15
<i>Poli134TUF</i>	LG6	0.27	13.30	<i>Poli1864TUF</i>	LG18	0.45	22.65
<i>Poli107TUF</i>	LG6	0.94	46.90	<i>Poli1010TUF</i>	LG18	1.00	50.00
<i>Poli1009TUF</i>	LG7	0.07	3.65	<i>Poli975TUF</i>	LG19	0.25	12.50
<i>Poli1801TUF</i>	LG7	0.56	28.15	<i>Poli55MHFS</i>	LG19	0.59	29.70
<i>Poli159TUF</i>	LG7	0.81	40.65	<i>Poli1490TUF</i>	LG19	0.98	49.20
<i>Poli1450TUF</i>	LG8	0.4	19.80	<i>Poli1773TUF</i>	LG20	0.83	41.65
<i>Poli1118TUF</i>	LG8	0.95	47.65	<i>Poli1779TUF</i>	LG20	0.88	43.75
<i>Poli1825TUF</i>	LG8	1.00	50.00	<i>Poli1838TUF</i>	LG20	1.00	50.00
<i>Poli1813TUF</i>	LG9	0.00	0.00	<i>Poli1852TUF</i>	LG21	0.22	10.95
<i>Poli1392TUF</i>	LG9	0.30	14.85	<i>Poli1827TUF</i>	LG21	0.23	11.70
<i>Poli1936TUF</i>	LG9	0.52	25.80	<i>Poli1925TUF</i>	LG21	0.97	48.45
<i>Poli753TUF</i>	LG10	0.12	5.75	<i>Poli1451TF</i>	LG22	0.00	0.00
<i>Poli1412TUF</i>	LG10	0.73	36.70	<i>Poli1579TUF</i>	LG22	0.28	14.05
<i>Po15</i>	LG10	0.89	44.55	<i>Poli1498TUF</i>	LG22	0.95	47.40
<i>Poli1642TUF</i>	LG11	0.02	0.80	<i>Poli1643TUF</i>	LG23	0.56	28.15
<i>Poli1795TUF</i>	LG11	0.39	19.55	<i>Poli193TUF</i>	LG23	0.92	46.10
<i>Poli907TUF</i>	LG11	0.68	33.85	<i>Poli-RC27-TUF</i>	LG23	1.00	50.00
<i>Poli1327TUF</i>	LG12	0.44	21.90	<i>Poli72MHFS</i>	LG24	0.00	0.00
<i>Poli2031TUF</i>	LG12	0.50	25.00	<i>Poli1906TUF</i>	LG24	0.52	26.05
<i>Poli212TUF</i>	LG12	0.95	47.40	<i>Poli1872TUF</i>	LG24	0.98	49.20

## 2.2 4 种二倍体的遗传多样性分析

利用分布于连锁群不同区域的微卫星标记分别进行 ND、MGD-1、MGD-2、MGD1H 的遗传分析,统计 4 种二倍体在多态位点的遗传多样性参数(表 3)。4 种二倍体的平均等位基因数和 *PIC* 值在连锁群的 3 个区域基本相同。随着由着丝粒

区域到远着丝粒区域 M-C 距离的增加,4 种二倍体的平均观测杂合度出现逐渐递增的趋势。其中,MGD-1 和 MGD-2 的指标变化幅度最大,二者在远着丝粒区域的观测杂合度达到了着丝粒区域的两倍以上。每种二倍体的纯合度呈现出与观测杂合度相反的递减变化趋势。

表 3 4 种二倍体的遗传统计指标  
Tab. 3 Genetic statistical data observed in four types of diploid

区域 region	亲本 parent	平均等位 基因数 average number of allele	平均观测 杂合度 average observed heterozygosity	子代 progeny	平均等位 基因数 average number of allele	平均观测 杂合度 average observed heterozygosity	期望 杂合度 expected heterozygosity	平均 <i>PIC</i> average <i>PIC</i>	纯合度 homozygosity
着丝粒 centromere	ND	2.857 1	0.464 3	ND	2.785 7	0.902 2	1.000 0	0.502 1	0.097 8
	MGD-1	2.000 0	1.000 0	MGD-1	2.000 0	0.386 2	0.500 0	0.372 1	0.613 8
	MGD-2	2.000 0	1.000 0	MGD-2	2.000 0	0.359 4	0.500 0	0.371 8	0.640 6
	MGD1H	2.000 0	0.633 3	MGD1H	2.000 0	0.574 7	0.500 0	0.363 0	0.425 3
连锁群中部 intermediate region of linkage group	ND	3.372 8	0.675 7	ND	3.381 0	0.920 2	1.000 0	0.557 5	0.079 8
	MGD-1	2.000 0	1.000 0	MGD-1	2.000 0	0.644 3	0.500 0	0.372 8	0.355 7
	MGD-2	2.000 0	1.000 0	MGD-2	2.000 0	0.631 2	0.500 0	0.372 3	0.368 8
远着丝粒 far from centromere	MGD1H	2.000 0	0.865 4	MGD1H	2.000 0	0.611 8	0.500 0	0.352 7	0.388 2
	ND	3.216 2	0.738 1	ND	3.189 2	0.958 0	1.000 0	0.603 7	0.042 0
	MGD-1	2.000 0	1.000 0	MGD-1	2.000 0	0.906 2	0.500 0	0.374 8	0.093 8
	MGD-2	2.000 0	1.000 0	MGD-2	2.000 0	0.870 8	0.500 0	0.374 3	0.129 3
	MGD1H	2.000 0	0.724 8	MGD1H	2.000 0	0.693 6	0.500 0	0.353 0	0.306 4

## 2.3 4 种二倍体的纯合性分析

在连锁群不同区域的多态性位点,统计 4 种二倍体中基因型表现为纯合的与杂合的个体数量及二者所占比例。在着丝粒区域,4 种二倍体的纯合个体所占比例最高,其范围为 8.8% ~ 29.1%;在远着丝粒区域,纯合个体所占比例最低,其范围为 2.4% ~ 23.2%。杂合个体所占比例

在连锁群上三个区域的变化规律与纯合个体相反。ND 与其余 3 种二倍体相比,在任何区域纯合个体所占比例均为最低。MGD-1 和 MGD-2 由着丝粒至远着丝粒区域,纯合个体比例呈现显著的递减变化。MGD1H 的纯合个体比例虽然也是逐渐降低,但其变化幅度并不如 MGD-1 和 MGD-2 明显(表 4)。

表 4 4 种二倍体纯合性分析  
Tab. 4 Analysis for homozygosity in four types of diploid

区域 region	组别 group	纯合个体数 homozygous individual	比例/% percentage	杂合个体数 heterozygous individual	比例/% percentage
着丝粒 centromere	ND	48	8.8	496	91.2
	MGD-1	319	58.6	225	41.4
	MGD-2	265	59.2	183	40.8
	MGD1H	149	29.1	363	70.9
连锁群中部 intermediate region of linkage group	ND	32	5.3	576	94.7
	MGD-1	211	34.7	397	65.3
	MGD-2	276	47.9	300	52.1
远着丝粒 far from centromere	MGD1H	131	27.3	349	72.7
	ND	28	2.4	1 124	97.6
	MGD-1	138	12.0	1 014	88.0
	MGD-2	132	12.5	924	87.5
	MGD1H	223	23.2	737	76.8

### 3 讨论

M-C 作图的原理是根据标记与着丝粒之间发生交换频率的高低,来推断连锁群上标记距离着丝粒的相对位置。类似的研究工作在众多水产动物都已经开展,如欧鳟 (*Salmo trutt*)<sup>[21]</sup>、斑马鱼 (*Danio rerio*)<sup>[22]</sup>、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[23]</sup>、鲤 (*Cyprinus carpio*)<sup>[24]</sup>、泥鳅<sup>[12]</sup>、日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*)<sup>[25]</sup>、太平洋牡蛎 (*Crasostrea gigas*)<sup>[26]</sup>、条斑星鲽<sup>[27]</sup>、大黄鱼<sup>[28]</sup>、中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)<sup>[29]</sup>、半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*)<sup>[30]</sup> 等等。纵观这些实验结果,多数都只是定位了 M-C 距离,而以此为基础进一步开展研究的报道并不多。在理论上,如果不存在交叉干涉则标记与着丝粒之间的重组率最大值为 0.667<sup>[28]</sup>,据此,本实验将 M-C 重组率高于此标准的 36 个标记划分为远着丝粒区域,将 M-C 重组率低于 0.3 的 17 个标记划分为着丝粒区域,将 M-C 重组率为 0.3~0.67 的 19 个标记划分为连锁群中部。利用连锁群上 3 个不同区域的标记鉴定牙鲆类型不同二倍体的遗传特征。研究结果显示,4 种二倍体的多态信息含量在不同区域的变化幅度较小,其范围为 0.353 0~0.603 7。借鉴以往的研究报道,标记的  $PIC > 0.5$  为高度多态位点, $0.25 < PIC < 0.5$  为中度多态位点; $PIC < 0.25$  为低度多态位点<sup>[31]</sup>。由此可见,本实验所选用的标记为中度和高度多态性微卫星标记,适用于进行牙鲆实验群体的遗传分析。

观测杂合度和纯合度指标呈现相反的变化趋势,所有二倍体在着丝粒区域的杂合度最低,纯合度最高;在远着丝粒区域则表现为杂合度最高,纯合度最低。这主要是因为着丝粒位置,等位基因之间不易发生交换,个体基因型多表现为纯合态;而在远着丝粒位置,等位基因之间易发生交换,个体基因型多表现为杂合态。因此,在着丝粒区域纯合基因型个体的出现频率显著高于杂合基因型个体,如选用此区域的标记去检测不同二倍体,将出现纯合度指标高、观测杂合度指标低于远着丝粒区域标记的检测结果。在连锁群上同一区域,ND 的平均等位基因数、观测杂合度和多态信息含量均高于其余二倍体,这主要是因为 ND 为普通杂交方式制备,子代个体基因型为父母本等位基因的随机组合,类型丰富。MGD-1 和 MGD-2

来自同一祖先,且二者子代个体等位基因仅来自母本,其在着丝粒区域表现出纯合型个体多,在远着丝粒区域表现出杂合型个体多。MGD1H 虽然为两性交配的二倍体,但其父母本为一个 MDG-1 和同时诱导的伪雄鱼二倍体,双亲在同一检测位点的基因型基本相同,其子代个体的基因型类似于 MGD-1 和 MGD-2 子代个体。因此,MGD-1、MGD-2、MGD1H 三者的各项遗传学统计指标数值及变化规律基本相同。

关于 MGD-1 和 MDG-2 的遗传分析已有研究者进行了研究,如叶小军等<sup>[32]</sup>报道大黄鱼 MGD-1、MGD-2 的观测杂合度和纯合度分别为 0.339 和 0.661、0.197 和 0.803。王桂兴等<sup>[4]</sup>分析牙鲆 MGD-1、MGD-2 的观测杂合度和纯合度分别为 0.875 和 0.125、0.775 和 0.225。大黄鱼两种减数分裂雌核发育二倍体的遗传参数与本研究中着丝粒区域标记的分析结果相似,而王桂兴等<sup>[4]</sup>的结果则与本研究中远着丝粒区域的标记分析结果相符。由此可知,同为进行 MGD-1、MGD-2 的遗传分析,大黄鱼所用的标记可能多数位于连锁群的着丝粒区域,而牙鲆分析所用的标记则位于远着丝粒区域。就 MGD-1、MGD-2 的遗传特征而言,无论使用连锁群上任何区域的标记,均为 MGD-1 的观测杂合度略高,MGD-2 的纯合度略高,表明通过连续两代诱导减数分裂雌核发育比诱导一代减数分裂雌核发育能够在一定程度上提高个体的纯合度。除了 MGD-1 和 MGD-2,本研究还比较了 MGD-1 为母本与同一家系诱导的伪雄鱼交配产生的 MGD1H,这种二倍体的各项遗传统计指标在连锁群不同区域的检测结果差异较小,但在远着丝粒区域其纯合个体所占比例是几种二倍体中最高的。在等位基因最易发生交换的区域,MGD1H 的纯合度为最高,由此推测如果使用 MGD1H 做亲本诱导减数分裂雌核发育制备出的二倍体可能比 MGD-2 更能够加速提高个体纯合程度。

综上所述,本研究选择牙鲆连锁群上着丝粒区域、染色体中部和远着丝粒区域的微卫星标记进行几种不同类型二倍体的遗传特征检测。所有二倍体的鉴定结果均表现出随着由着丝粒至远着丝粒区域 M-C 距离的增加,个体纯合度逐渐降低、杂合度逐渐升高的变化规律,表明染色体上标记位置不同对鉴定个体遗传特征具有显著影响。

连续两代诱导减数分裂雌核发育比一代诱导减数分裂雌核发育提高了个体纯合性。传统的良种选育多采用先杂交后纯化的过程,使得培育出的新品种具有高的遗传稳定性和个体一致性,这往往需要几代甚至十几代的连续交配才能够完成。而利用 MGD1、MGD2、MGDH1 等材料,能够在较短的世代间隔内提高个体的纯合度,从而加速鱼类育种进程。本实验估计了 72 微卫星标记与着丝粒之间的相对距离,这项工作可以作为牙鲆 M-C 作图的起点,为未来确定着丝粒在连锁群上的位置和基因定位等研究提供有利信息。

#### 参考文献:

- [1] 雷霖霖. 海水鱼类养殖理论与技术[M]. 北京:中国农业出版社,2011:482-483.
- [2] 刘海金,侯吉伦,常玉梅,等. 真鲷精子诱导牙鲆减数分裂雌核发育[J]. 水产学报,2010,34(4):508-514.
- [3] 刘海金,刘永新,王玉芬,等. 牙鲆减数分裂与有丝分裂雌核发育的遗传差异[J]. 水产学报,2010,34(6):898-904.
- [4] 王桂兴,刘海金,张晓彦,等. 牙鲆连续两代减数分裂雌核发育家系的遗传特征[J]. 中国水产科学,2012,19(3):381-389.
- [5] 柿本芳久,相田聡,荒井克俊,等. トラフグ *Takifugu rubripes* における低温、高温処理による雌性発生二倍体の誘起[J]. 広島大生物生産学部紀要,1994,33(1):103-111.
- [6] Tabata T. Studies on chromosome manipulation in hirame *Paralichthys olivaceus* [J]. Fish Genetics and Breeding Science,1992,13(1):9-18.
- [7] Yamamoto E. Studies on sex manipulation and production of populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminch et Schlegl) [J]. Aquaculture,1999,173(1-4):235-246.
- [8] 杨景峰,陈松林,苏鹏志,等. 异源精子诱导条斑星鲷雌核发育的研究[J]. 水产学报,2009,33(3):372-378.
- [9] Felip A, Piferrer F, Carrillo M, et al. The relationship between the effects of UV light and thermal shock on gametes and the viability of early developmental stages in a marine teleost fish, the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. Heredity,1999,83(4):387-397.
- [10] Piferrer F, Cal R M, Gómez C, et al. Induction of gynogenesis in the turbot (*Scophthalmus maximus*): Effects of UV irradiation on sperm motility, the Hertwig effect and viability during the first 6 months of age [J]. Aquaculture,2004,238(1-4):403-419.
- [11] Jian H X, Feng Y, Wei S, et al. Induction of diploid gynogenesis in turbot (*Scophthalmus maximus*) with left-eyed flounder *Paralichthys olivaceus* sperm [J]. Aquaculture International,2008,16(6):623-634.
- [12] Morishima K, Nakayama I, Arai K, et al. Microsatellite-centromere mapping in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Genetica,2001,111(1-3):59-69.
- [13] 王晓清,王志勇,柳小春,等. 大黄鱼人工诱导雌核发育后代的微卫星标记分析[J]. 遗传,2006,28(7):831-837.
- [14] 柿本芳久,相田聡,荒井克俊,等. マコガレイ *Limanda yokohamae* における温度および圧力処理による雌性発生二倍体の作出とメチルテストステロン浸漬処理による性転換[J]. 広島大生物生産学部紀要,1994,33(1):113-124.
- [15] 朱晓琛,刘海金,孙效文,等. 微卫星评价牙鲆雌核发育二倍体纯合性[J]. 动物学研究,2006,27(1):63-67.
- [16] 季旭,孙效文,杨立更,等. 微卫星标记对牙鲆有丝分裂雌核发育家系的亲子鉴定[J]. 动物学研究,2008,29(1):25-30.
- [17] 田永胜,汪娣,王磊,等. 牙鲆 F1 代近交系、雌核发育系的建立及遗传检测[J]. 海洋学报:中文版,2011,33(3):114-124.
- [18] Castaño-Sánchez C, Kanako F, Akiyuki O, et al. A second generation genetic linkage map of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. BMC Genomics,2010,11(1):554.
- [19] Thorgaard G H, Allendorf F W, Knudsen K L. Gene-centromere mapping in rainbow trout: high interference over long map distances [J]. Genetics,1983,103(4):771-783.
- [20] 刘贤德,韦信键,蔡明夷,等. 大黄鱼 22 个微卫星标记在 F<sub>1</sub> 家系中的分离方式及与生长性状的相关分析[J]. 水产学报,2012,36(9):1322-1330.
- [21] Estoup A, Presa P, Krieg F, et al. (CT)<sub>n</sub> and (GT)<sub>n</sub> microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout) [J]. Heredity,1993,71(5):488-496.
- [22] Kauffman E J, Gestl E E, Kim D J, et al. Microsatellite-centromere mapping in the zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Genomics,1995,30(2):337-341.
- [23] Sakamoto T, Danzmann R G, Gharbi K, et al. A

- microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates [ J ]. *Genetics*, 2000, 155(3) : 1331 - 1345.
- [ 24 ] Aliah R S, Taniguchi N. Gene-centromere distance of six microsatellite DNA loci in gynogenetic nishikigoi (*Cyprinus carpio*) [ J ]. *Suisan-Ikushu*, 2000, 29(1) : 113 - 119.
- [ 25 ] Nomura K, Morishima K, Tanaka H, *et al.* Microsatellite-centromere mapping in the Japanese eel (*Anguilla japonica*) by half-tetrad analysis using induced triploid families [ J ]. *Aquaculture*, 2006, 257(1-4) : 53 - 67.
- [ 26 ] Li Q, Kijima A. Microsatellite analysis of gynogenetic families in the Pacific oyster, *Crasostrea gigas* [ J ]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2006, 331(1) : 1 - 8.
- [ 27 ] Zineb L, Chiharu K, Kagayaki M, *et al.* Genetic verification of induced gynogenesis and microsatellite-centromere mapping in the barfin flounder, *Verasper moseri* [ J ]. *Aquaculture*, 2007, 272(Suppl. 1) : 115 - 124.
- [ 28 ] Li Y Y, Cai M Y, Wang Z Y, *et al.* Microsatellite-centromere mapping in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) using gynogenetic diploid families [ J ]. *Marine Biotechnology*, 2008, 10(1) : 83 - 90.
- [ 29 ] Wang H X, Li F H, Xiang J H, *et al.* Microsatellite-centromere distances and microsatellite diversity in different ploidy classes of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus Chinensis*) [ J ]. *Genetica*, 2008, 132(1) : 43 - 50.
- [ 30 ] Ji X S, Chen S L, Liao X L, *et al.* Microsatellite-centromere mapping in *Cynoglossus semilaevis* using gynogenetic diploid families produced by the use of homologous and non-homologous sperm [ J ]. *Journal of Fish Biology*, 2009, 75(2) : 422 - 434.
- [ 31 ] Vaiman D, Mercier D, Moazami-Goudarzi K, *et al.* A set of 99 cattle microsatellite; characterization synteny mapping and polymorphism [ J ]. *Mammalian Genome*, 1994, 5(5) : 288 - 297.
- [ 32 ] 叶小军, 王志勇, 刘贤德, 等. 大黄鱼连续两代雌核发育群体的微卫星标记分析 [ J ]. *水生生物学报*, 2010, 34(1) : 144 - 151.



## Identifying genetic characteristics of different diploids in Japanese flounder based on M-C mapping

HAN Huizong<sup>1</sup>, JIANG Li<sup>2</sup>, LIU Yi<sup>3</sup>, WANG Guixing<sup>4</sup>, LIU Haijin<sup>2</sup>, LIU Yongxin<sup>2\*</sup>, LIU Yingjie<sup>2\*</sup>

(1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China;

3. Animal Science and Technology College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

4. Beidaihe Central Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100, China)

**Abstract:** To analyze the effects of microsatellite markers located in different positions in linkage group on identifying genetic characteristics of different diploids in Japanese flounder in this study, the mature spawners selected from Japanese flounder selection and breeding flounder were used to produce the normal diploids (ND), meiotic gynogenetic diploids (MGD-1), successive two generation meiotic gynogenetic diploids (MGD-2) and inbred diploid (MGD1H) by crossing mature female from MGD-1 with induced sex reversed male. A set of 72 microsatellite markers distributed evenly in 24 linkage groups were selected from the published genetic linkage maps of Japanese flounder. To estimate microsatellite-centromere map distances, four MGD-1 lines were produced. Under the assumption of complete interference, 17 markers were located in the centromeric region, 36 in the distant region from the centromere and 19 in the intermediate region of linkage groups. The genetic characteristics of four types of diploid in Japanese flounder were identified by these markers. Analysis showed that the number of allele (*A*) and polymorphism information content (*PIC*) have limited variation range, in which the *A* and *PIC* of ND were the highest while those of MGD1H were the lowest. In four types of diploid, the observed heterozygosity decreased and homozygosity increased as microsatellite-centromere map distance increased. The highest and lowest percentages of homozygous individuals were found in centromeric region from 8.8% to 29.1% and in telomeric region from 2.4% to 23.2%, respectively. The variation ranges of MGD-1 and MGD-2 were significantly higher than that of the other diploids. The results demonstrated that choice of microsatellite markers located in different positions in linkage group has great impact on identifying genetic characteristics of different diploids in Japanese flounder.

**Key words:** *Paralichthys olivaceus*; microsatellite; centromere; gynogenetic diploid; genetic map

**Corresponding author:** LIU Yongxin. E-mail: liuyx@cafs.ac.cn; LIU Yingjie. E-mail: lyj@cafs.ac.cn